

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 38 15 645 A 1**

⑤① Int. Cl. 4:
A61 K 35/14

②① Aktenzeichen: P 38 15 645.8
②② Anmeldetag: 7. 5. 88
④③ Offenlegungstag: 16. 11. 89

Behördeneigentum

DE 38 15 645 A 1

⑦① Anmelder:

Biotest Pharma GmbH, 6072 Dreieich, DE

⑦④ Vertreter:

Wolff, H., Dipl.-Chem. Dr.jur.; Beil, H., Dr.jur.,
Rechtsanwälte, 6230 Frankfurt

⑦② Erfinder:

Gänshirt, Karlheinz, Dipl.-Chem. Dr., 6072 Dreieich,
DE; Handel, Klaus Dieter, Dipl.-Ing. Dr., 6100
Darmstadt, DE; Walker, Wolfram, Dipl.-Chem. Dr.,
6074 Rödermark, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur Herstellung eines reinen Thrombozytenkonzentrates aus Gesamtblut

Verfahren zur Herstellung eines reinen Thrombozytenkonzentrates durch Abtrennung des Plasmas und der Erythrozytenkomponente von zentrifugiertem Gesamtblut aus einem Beutel mit einer oberen Auslaßleitung, einem dort angebrachten Mehrfachbeutelverbindungssystem sowie einer unteren Auslaßleitung und einer daneben angeordneten Fülleitung, und nachfolgende zweite Zentrifugation der Buffy-Coat-Schicht in diesem Beutel nach Fixierung desselben in einem in die Zentrifuge einzusetzenden Behälter und Abtrennung des Thrombozytenkonzentrates aus diesem Beutel.

DE 38 15 645 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines reinen Thrombozytenkonzentrates aus stabilisiertem Gesamtblut.

Bei der üblichen Thrombozyten-Gewinnung wird zunächst das Gesamtblut so zentrifugiert, daß eine obere thrombozytenreiche Plasmaschicht gebildet wird. Diese Schicht wird anschließend in einen zweiten Beutel übertragen und dieser wiederum bei hoher g-Zahl (2000–5000 g) zentrifugiert. Dabei werden eine obere Schicht aus thrombozytenarmem Plasma und eine untere Schicht, die Thrombozyten, erhalten. Nach Abtrennen des plättchenarmen Plasmas wird die Thrombozytenschicht in ca. 50 ml zurückbleibendem Plasma resuspendiert und bildet das Thrombozytenkonzentrat.

Aufgrund der hier verwendeten Beutel sind reine Konzentrate häufig nicht zu erhalten, da unter anderem im oberen Beutelteil befindliche Abbrechteile bzw. Auslaß-Stutzen zu einem Festhalten von unerwünschten Zellen und dadurch bei Überleitung des plättchenreichen Plasmas zur Kontamination des Konzentrates führen können.

Thrombozytenkonzentrate mit hoher Reinheit können, wie von Pieters et al. (Vox Sang. 49, 01–05, 1985) beschrieben, aus Blutkonserven gewonnen werden. Hierzu wird das in einem durchsichtigen Beutel, z. B. mit einer oberen sowie einer unteren Auslaßleitung, wie in der DE-OS 30 12 227 oder in der EP-A 86 111 079 beschrieben, befindliche Gesamtblut zunächst mit hoher g-Zahl zentrifugiert. Dabei bilden sich eine obere Plasmaschicht, eine mittlere Buffy-Coat-Schicht, welche Leukozyten und Thrombozyten enthält, sowie eine untere Erythrozytenschicht aus.

Mittels geeigneter Vorrichtungen, wie z. B. in der DE-OS 34 17 892 beschrieben, werden das plättchenarme Plasma und die Buffy-Coat-Schicht jeweils in separate Beutel abgepreßt.

Anschließend wird das Buffy-Coat mit etwa $\frac{1}{3}$ des Volumens mit Plasma versetzt und bei niedriger g-Zahl (bis 1000 g) zentrifugiert. Hierbei wird der Beutel in einer speziellen Vorrichtung im Zentrifugenbecher gehalten. Danach wird die obere Schicht, das Thrombozytenkonzentrat, abgetrennt.

Bei dieser Methode sind Verluste jedoch nicht zu vermeiden, da hier die viskose Buffy-Coat-Schicht, die die Thrombozyten enthält und sehr leicht an den Beuteltwänden hängen bleibt, zunächst in einen anderen Beutel ausgetragen wird.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Bereitstellung eines Thrombozytenkonzentrates zu entwickeln, welches verlustfrei aus Gesamtblut erhalten werden kann und einen hohen Reinheitsgrad aufweist.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das in Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung beschriebene Verfahren gelöst.

Erfindungsgemäß wird hierbei die Übertragung der Buffy-Coat-Schicht vom ursprünglichen Beutel in einen Übertragungsbeutel und dadurch Verluste an Thrombozytenkonzentrat vermieden.

Weiterhin wird durch das Fixieren des Beutels während der zweiten Zentrifugation – entweder durch direktes Einhängen oder durch Befestigung entlang der Linie A-B, die die Abtrennung des oberen Beutelteils begrenzt – eine Kontamination des oberen Beutelteils und somit des Plasmas mit Blutzellen unterbunden, da der an sich flexible Beutel durch die Fixierung definiert

in der Zentrifuge gehalten wird.

Der die verschiedenen Blutkomponenten enthaltende, mit einer oberen und einer unteren Auslaßleitung versehene Beutel wird mittels einer automatisch betriebenen und entsprechend gesteuerten Vorrichtung ausgepreßt. Dabei können das Blutplasma und die roten Blutzellen gleichzeitig durch die obere bzw. untere Auslaßleitung ausgetragen werden. Der Beutel wird im wesentlichen durch gleichförmiges Zusammendrücken, z. B. zwischen zwei im Ausgangszustand im Winkel angeordneten Platten, zusammengepreßt. Mittels geeigneter Detektoren, welche an einem Auslaßschlauch oder im Beutelbereich angeordnet sein können, kann das Abpreßen bis zu einem vorgewählten Niveau erfolgen. Mit Detektoren im Beutelbereich wird beispielsweise die Buffy-Coat-Schicht auf gleichem Niveau gehalten. Der obere Auslaß wird automatisch gesperrt bzw. geöffnet, wenn die dünne Zwischenschicht des zentrifugierten Gesamtbluts entweder oberhalb oder unterhalb der festgelegten Grenze liegt. Dieser Vorgang wird beendet, sobald ein vorgewähltes Endvolumen erreicht ist. Mit einem Detektor im Bereich der oberen Auslaßleitung wird die obere Auslaßleitung gesteuert, sobald die Blutzellenschicht diesen Detektor erreicht. Die Erythrozytenschicht wird solange noch weiter abgepreßt, bis das vorgewählte Endvolumen erreicht worden ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden daher Blutbeutel verwendet, welche mindestens einen oberen Auslaß und einen unteren Auslaß aufweisen und zusätzlich so konstruiert sind, daß sie während der Zentrifugation nicht beschädigt werden können und eine Verwirbelung der auszutragenden Komponenten vermieden wird.

Das Verfahren und die erfindungsgemäßen Blutbeutel werden anhand der Abb. 1 und 2 näher erläutert.

Abb. 1 zeigt schematisch einen Blutbeutel, wie er im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt wird. Er weist nur am oberen Ende eine Auslaßleitung (5), die durch ein Mehrfachverbindingssystem, z. B. ein Abbrechteil (4), verschlossen ist, auf. Ihr gegenüber ist am unteren Ende eine Auslaßleitung (6) angeordnet. Neben der unteren Auslaßleitung (6) befindet sich ein Füll- bzw. Blutentnahmeschlauch (7).

Mit dieser Beutelkonstruktion wird gewährleistet, daß das Abbrechelement (4) während des Zentrifugierens immer oben liegt und somit nicht zerbrechen kann. Da der untere Beutelteil kein solches Abbrechelement aufweist, wird hier eine Verwirbelung des Sediments bei der Handhabung vermieden. Darüberhinaus werden keine unerwünschten Blutzellen durch Anschluß-Stutzen festgehalten.

Da die Zulaufleitung (7) im unteren Beutelteil angeordnet ist, wird eine Kontamination der oberen Plasmaschicht mit Blutzellen weiter reduziert.

Somit werden die Plasma- und Erythrozytenschicht von der Buffy-Coat-Schicht abgetrennt, ohne daß unerwünschte Blutzellen zurückbleiben. Die nachfolgende Zentrifugation des Buffy-Coat in dem in der senkrechten Position fixierten Beutel (1), welcher nur zu einem Drittel gefüllt ist, führt Thrombozytenkonzentraten, welche über eine nicht kontaminierte Auslaßleitung bzw. Beutelskopf in reinem Zustand ausgetragen werden können.

Das in der Abb. 2 dargestellte Blutbeutelsystem veranschaulicht das Verfahren zur Herstellung eines reinen Thrombozytenkonzentrates. Es enthält einen das Spenderblut aufnehmenden Beutel (1) mit Stabilisator und drei Übertragungsbeutel (2) und (2a) sowie (3). Der Blutbeutel (1) mit dem Abbrechteil (4) ist über die obere

Auslaßleitung (5) mit den Übertragungsbeuteln (2) und (2a) über die untere Auslaßöffnung (6) mit dem Beutel (3) verbunden. Über den Füll- bzw. Blutentnahmeschlauch (7) wird in den Beutel (1) Blut stabilisiert und gespendet, die Fülleitung (7) abgesperrt und das Blut anschließend bei hoher g-Zahl zentrifugiert. Hierbei werden eine obere Plasmaschicht, eine mittlere Buffy-Coat-Schicht und eine untere Erythrozytenschicht erhalten. Mittels einer automatisch gesteuerten Vorrichtung wird anschließend das plättchenarme Plasma über Leitung (5) in den Beutel (2) und die Erythrozytenschicht über Leitung (6) in den Beutel (3) übertragen. Das Erreichen der jeweiligen Grenzschicht kann mittels Schlauch- oder Beuteldetektoren ermittelt werden. Bei Erreichen eines vorgewählten Endvolumens wird der Abpreßvorgang beendet. Gegebenenfalls kann der das Erythrozytenkonzentrat aufnehmende Beutel (3) ein Konservierungsmittel enthalten. Das plättchenarme Plasma kann gegebenenfalls in zwei Fraktionen mit verschiedener Qualität aufgeteilt werden. Das zuerst abgepreßte Plasma, entsprechend ca. $\frac{2}{3}$ des Plasmavolumens, weist einen deutlich niedrigeren Zellgehalt auf als die zweite Fraktion.

Nachdem Plasma- und Erythrozytenschicht abgepreßt sind, werden die Auslaßleitungen (5) und (6) geschlossen und die Beutel (2) und (3) abgetrennt.

Der die Buffy-Coat-Schicht enthaltende Beutel (1) wird anschließend an den oberen Enden in einen Behälter eingehängt und erneut bei niedriger g-Zahl zentrifugiert. Vorzugsweise kann der nur zu einem Drittel gefüllte Beutel (1) auch im oberen Drittel abgeklemmt und entlang dieser Abtrennlinie A-B im Behälter aufgehängt werden.

Nach dem Zentrifugieren wird der Beutel (1) dem Zentrifugenbehälter entnommen. Er enthält eine obere Schicht, das Thrombozytenkonzentrat, und eine untere Schicht mit Zellen des Buffy-Coats.

Das Thrombozytenkonzentrat wird über die Auslaßleitung (5) in den Übertragungsbeutel (2a) abgepreßt. Das hierbei erhaltene reine Thrombozytenkonzentrat kann in besonderen Beuteln bei 20–24°C über mehrere Tage stabil gelagert werden.

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht zum einen darin, daß die aus Gesamtblut erhältliche Buffy-Coat-Schicht zur weiteren Auftrennung nicht in einen anderen Beutel übertragen werden muß. Dadurch werden Verluste an Konzentratkomponenten vermieden.

Durch den Einsatz eines Sammelbeutels ohne zusätzlichen Anschlußstutzen mit nur einem Mehrfachbeutelverbindungssystem, z. B. einem Abbrechteil, werden Aufwirbelungen der einzelnen Komponentenschichten vermieden. Durch Anordnung nur eines Schlauches im Beutelkopf wird eine Kontamination der hier durchgeleiteten Komponenten vermieden. Es werden somit reine Präparate erhalten. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können Thrombozyten-Präparationen in hoher Reinheit auf einfache rationelle Weise verlustfrei aus Gesamtblut hergestellt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines reinen Thrombozytenkonzentrates aus Gesamtblut, dadurch gekennzeichnet, daß man

a) das in einem flexiblen Beutel mit einer oberen und einer unteren Auslaßleitung enthaltene Gesamtblut bei hoher g-Zahl zentrifugiert,

b) die obere plättchenarme Plasmaschicht über die obere Leitung und die untere Erythrozytenschicht über die untere Leitung auspreßt,

c) den noch die Buffy-Coat-Schicht und Restplasma enthaltenden ursprünglichen Beutel nach Durchmischung hängend bei niedriger g-Zahl zentrifugiert und

d) das erhaltene Thrombozytenkonzentrat über die obere Auslaßleitung auspreßt und die im unteren Teil des Beutels befindlichen Zellen im Beutel läßt.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der ursprüngliche, die Buffy-Coat-Schicht enthaltende Beutel in der oberen Hälfte entlang der Linie A-B abgequetscht und während der zweiten Zentrifugation entlang dieser Abtrennlinie in einem Behälter aufgehängt wird.

3. Blutbeutel, insbesondere zur Verwendung im Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine Einlaßleitung (5) am oberen Ende und eine Auslaßleitung (6) sowie der Füll- bzw. Blutentnahmeschlauch (7) am unteren Beutelteil angeordnet sind und nur ein Mehrfachbeutelverbindungssystem (4) am oberen Ende des Beutels angebracht ist und kein Auslaßstutzen vorhanden ist.

- Leerseite -

3815645

9

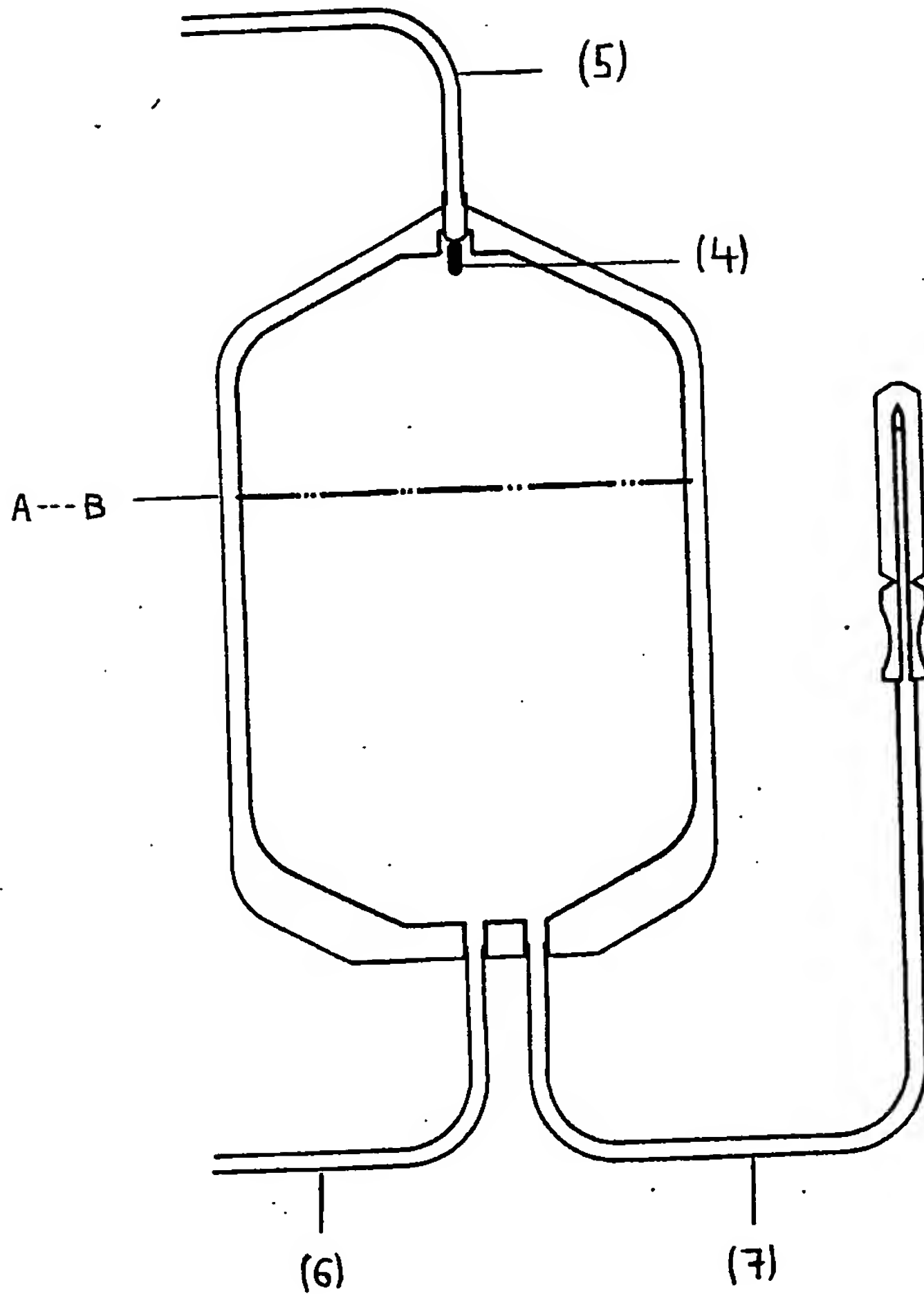


Abb. 1

3815645

10*

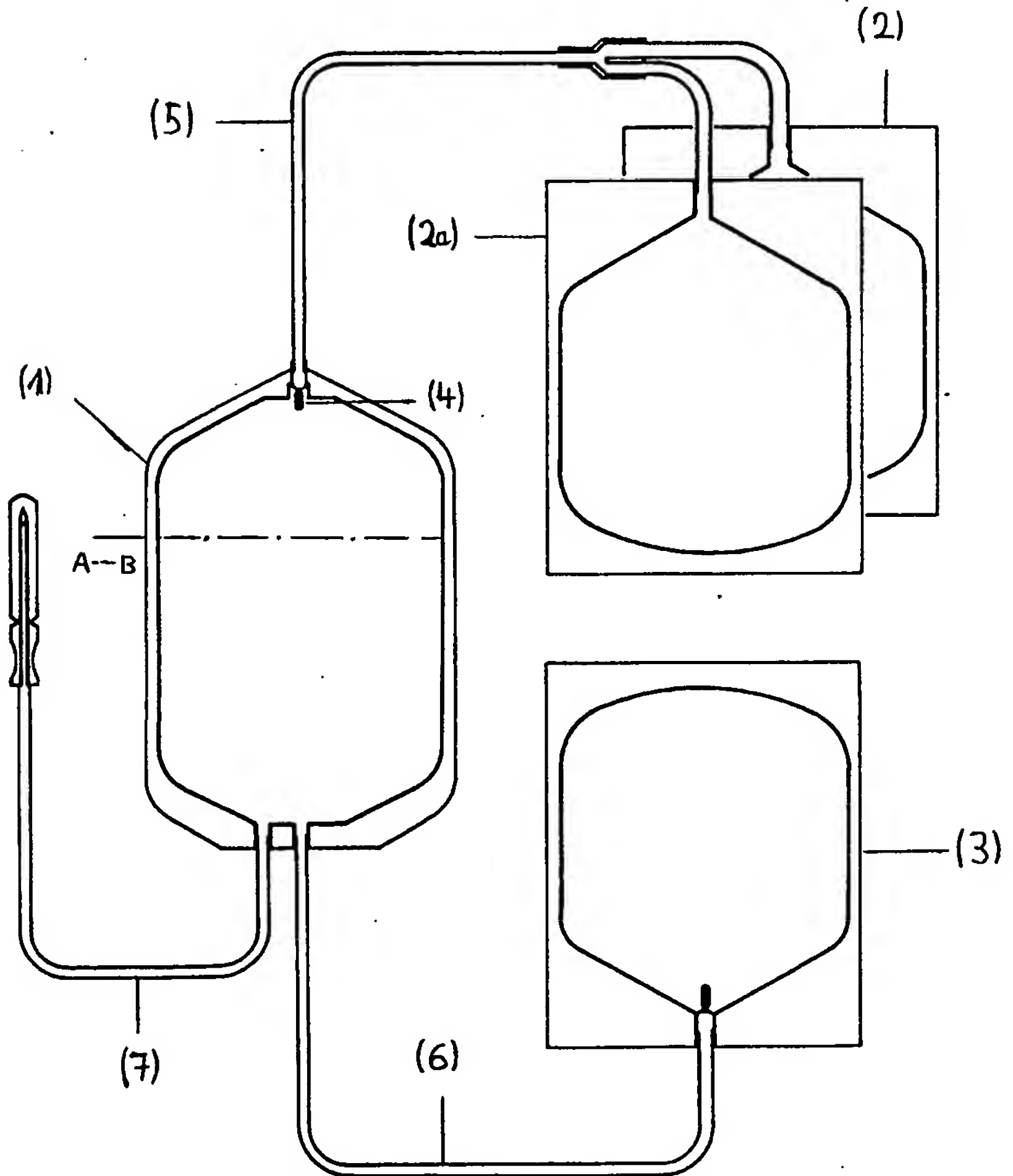


Abb. 2